

**UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE - UNESC**  
**CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**ANA PAULA MOREIRA**

**EFEITO DOS METAIS PESADOS EM ORGANISMOS AQUÁTICOS:**  
***O USO DO *Geophagus brasiliensis* (Quoy & Gaimard, 1824)***  
**COMO BIOINDICADOR**

**CRICIÚMA**  
**2013**

**ANA PAULA MOREIRA**

**EFEITO DOS METAIS PESADOS EM ORGANISMOS AQUÁTICOS:  
*O USO DO Geophagus brasiliensis (Quoy & Gaimard, 1824)*  
COMO BIOINDICADOR**

Trabalho de Conclusão de Curso, apresentado para obtenção do grau de Bacharel, no curso de Ciências Biológicas da Universidade do Extremo Sul Catarinense, UNESC.

Orientadora: Profa. Dra. Tatiana Barichello  
Coorientador: Prof. Ms. Claudio Ricken

**CRICIÚMA**

**2013**

**ANA PAULA MOREIRA**

**EFEITO DOS METAIS PESADOS EM ORGANISMOS AQUÁTICOS:  
*O USO DO Geophagus brasiliensis (Quoy & Gaimard, 1824)*  
COMO BIOINDICADOR**

Trabalho de Conclusão de Curso  
aprovado pela Banca Examinadora para  
obtenção do Grau de Bacharel, no Curso de  
Ciências Biológicas da Universidade do  
Extremo Sul Catarinense, UNESC, com Linha  
de Pesquisa em Ecotoxicologia de  
Ecossistemas Aquáticos

Criciúma, 26 de junho de 2013.

**BANCA EXAMINADORA**

Prof. Claudio Ricken - (Ms) - Coorientador

Prof. Claus Troger Pich - (Dr) - (UFSC/IFSC)

Prof. Jairo José Zocche - (Dr) - (UNESC)

*Minha mãe Ilza, que nos momentos mais difíceis, não me deixou desistir.*

## **AGRADECIMENTOS**

Um trabalho, nunca é feito por uma pessoa apenas, ele é realizado em grupo, e desse grupo, criam-se elos, elos do qual surgem grandes e verdadeiras amizades; não é difícil nomear as pessoas que desse trabalho fizeram parte, pois cada uma foi de extrema importância para cada uma das numerosas etapas até a conclusão desse trabalho, desde a escolha do tema, espero não esquecer ninguém.

Antes de qualquer coisa, tenho que agradecer a Deus, a força e alicerce de minha vida.

A minha mãe Ilza, que desde o primeiro dia de aula da minha vida, eu com 2 anos e um pouquinho, esteve ao meu lado me apoiando, dando força e nunca deixando que eu desistisse de meus sonhos; na escolha desse curso, foi de fundamental necessidade o pilar que ela ergueu para que eu não desistisse, as barreiras superadas foram árduas, contudo nunca desistimos, enquanto ninguém mais apostava que fosse dar certo, a gente mostrou que era capaz; posso afirmar que ela fez a graduação comigo, a cada descoberta era uma aula dentro de casa. Mãe meus mais sinceros obrigada por tudo.

Ao meu irmão Ariel, que mesmo sendo meu irmão mais novo, sempre me deu muita força pra ir em frente, me emprestava dinheiro pros benditos Xerox e muitas vezes, ia ao meu encontro na parada de ônibus pra me ajudar com os livros, com a chuva ou só pra que não ir sozinha embora. Ele é o cara.

Ao meu irmão Álvaro, que sempre deixou claro que me admirava pelo esforço que eu estava fazendo ao dar continuidade ao curso e que mesmo de longe, me dava muita força, mesmo quando pra ele as coisas não estavam boas, o sorriso no rosto a frase “é isso aí minha irmã, não desiste, mostra que tu capaz” nunca saíram do repertório dele. Meu irmão, você é 1.000.000.

Ao meu irmão Aldo, que varias vezes foi junto a universidade me socorrer, ver como eu estava e ver a quantas andavam o curso ou então convidar minhas amigas e eu para irmos fazer almoço no “Ap do Manhã”.

Ao meu irmão emprestado, André, que mesmo não tendo o mesmo DNA correndo em nossas veias, foi sempre um irmão pra mim e para meu irmão Ariel, sendo sempre presente e brincalhão como um bom irmão é. Valeu Gabé;

A minha sobrinha e afilhada Ariely, que vive dizendo: “quero ser igual a tia Paula quando crescer”, que me ligava falando que queria que eu fosse buscar ela

que tava com saudade de brincarmos e fazermos arte, e que muitas vezes tive que explicar que tava com trabalho e prova e não podia ser naquele final de semana, e ela dizia que ia esperar até a tia terminar a prova e os relatórios.

Ao meu pai, que quando entendeu o que eu fazia, voltou a fazer mais parte da minha vida e se mostrou disponível pra me ajudar, principalmente com os horários das saídas a campo e com os imprevistos. Obrigada por voltar.

A minha orientadora, Dra. Tatiana Barichello, que prontamente aceitou o desafio de participar de um tema totalmente novo para ela, sem medo e com toda a força que pode, me ajudando em cada detalhe. Essa parceria rendeu bons frutos que ainda estamos colhendo. Obrigada por tudo.

Ao meu coorientador, Ms. Claudio Ricken, que quando expliquei o que queria fazer, me acolheu de braços abertos, dando novas ideias, indo a campo e me fornecendo informações essenciais a conclusão desse trabalho. Daqui saiu uma boa parceria que esta dando certo. Obrigada por tudo Ricken.

A professora Ms. Cleonice Maria Michelin, que foi como uma terceira orientadora desse trabalho, sempre sanando minhas dúvidas e dando ideias para trabalhar.

Ao professor Marcos Tavares Dias, da EMBRAPA do Amapá, que prontamente me atendeu quando dúvidas surgiram a respeito de dados e metodologia para trabalho com peixes. Disponibilizando seu livro, que chegou em 10 dias e desde então vem me auxiliando e prontamente respondendo a dúvidas que ainda tenho. Posso afirmar que fui orientada por um grande mestre.

A toda a equipe do Laboratório de Microbiologia Experimental, minha equipe preferida, a Caroline Silva da Costa (Carolzinha), que foi como uma irmã, criamos uma amizade que jamais vou esquecer, toda a força, brincadeira, reclamação e choro que tivemos juntas foi uma complementação para nossa vida e para conclusão de nossos trabalhos, Jaqueline da Silva Generoso (Tia Jaque), que me ensinou grandes coisas; ao Samuel Galvão Elias (Samuca), o calouro que eu mais pentelhei durante toda a graduação, mas que sempre foi o rapaz mais calmo e dedicado que vi, me apresentou a melhor droga para estudantes de Biologia, a cafeína; a Grazi, Jaquinha e a Luana, que sempre tinham um tempinho e uma vaguinha no laboratório; e aos demais membros da equipe, Michael Hitaru Tashiro, Caroline Dagostin, Lutiana Roque Simões e Paulo Eduardo Aveline, amigos dessa jornada que sempre se mostravam interessados para ouvir minhas reflexões sobre

metais pesados e peixes. Obrigada meus amigos.

A equipe que me ajudou no Laboratório de Neurociências, em especial a Amandinha, Josi e Ana Maria, que me auxiliaram desde o começo com as amostras e análises. Esse trabalho também é de vocês meninas.

Aos meus colegas de sala de aula, em especial minha super prima emprestada, Maielen Machado de Jesus, minha irmã de dia do aniversário, Lucilene Possamai Nunes, a super formiga Gabriela Daminelli Borges, a chefona Karina Oliveira Teixeira e ao chatinho e birrento Gustavo Colombo Dal Pont, sem essa equipe de arteiros, com nossas ideias e conversar durante a aula e teorias adoidadas, a faculdade não seria a mesma coisa, a vida não seria a mesma coisa. Obrigada por me aturarem gente.

Aqueles amigos, que não foram de sala de aula, mas sim de uma vida toda, Vanessa Sartor, minha sempre amada “maninha”, aos meus gêmeos preferidos, Lucas e Guilherme Francisco Guollo, as minha amigas Franciele Rabello, Maria Aparecida Figueiredo, Franciele Rodrigues, Katiamara e Kelen Zadriski, Luana Pacheco, Suliwan da Silve Silverio, Cristiano Cardoso Mello e Guilherme De Biasi, agradeço pela amizade e companheirismo, em especial a meus dois arquitetos preferidos, que aturaram meus surtos com peixes, minhas teorias de conspiração e a pegação de pé por causa das namoradas, Fernando Rosso e Moisés Aguiar, realmente sem vocês, não seria a mesma coisa.

A todos os professores, desde a tia Lurdes, minha primeira professora, até meus professores do ensino médio, magistério, em especial a César Augusto Rilo Fernandes, Adriano Dias e a Simone Rocha da Rosa, em quem me espelhei ao optar pela biologia, e também aos professores do curso Rafael Martins, Birgit Harter Marques e em especial ao sempre lembrado, Claus Troger Pich.

Ao engenheiro ambiental, Tiago Luiz Silva da Costa, que desde 2012 vem me ajudando com dados e fontes para a publicação do artigo e término do trabalho, criando um elo de amizade e companheirismo, muito obrigada Tiago.

E a todos que estiveram presente em minha vida nesses últimos anos.

*“Nem sempre o produto final é o mais importante. Por vezes a riqueza se esconde é no processo das descobertas. O resultado é quase nada perto das oportunidades que o processo nos entrega.”*

*Padre Fábio de Melo*

*“Quando a última árvore tiver caído, quando o último rio tiver secado, quando o último peixe for pescado, Vocês vão entender que dinheiro não se come.”*

*Provérbio Indígena*



## RESUMO

À medida que a humanidade aumenta sua capacidade tecnológica de intervir na natureza, surgem os conflitos quanto ao uso do espaço, dos recursos e da disposição dos resíduos no ambiente. Metais no meio aquático podem ser bioacumulados por organismos ou passivamente a partir da água, por absorção facilitada. Bioindicadores são definidos como qualquer resposta a um contaminante ambiental ao nível individual, medidos no organismo ou matriz biológica, indicando um desvio do status normal que não pode ser detectado no organismo intacto. O *Geophagus brasiliensis* é uma espécie nativa de peixe do Brasil, e vem sendo utilizado para avaliar níveis de contaminação dos recursos hídricos. Parâmetros bioquímicos como avaliação da acetilcolinesterase, carbonilação de proteínas e espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico tem sido relatado como indicadores de ambientes contaminados por metais pesados. Parâmetros hematológicos também vêm sendo utilizado para avaliação de alterações na biota aquática. O objetivo de nosso estudo é avaliar o *Geophagus brasiliensis* como biomarcador aquático ambiental em áreas contaminadas por mineração. O sangue dos animais foi coletado via punção cardíaca enquanto os animais estavam vivos; essas amostras foram homogeneizadas junto ao anticoagulante EDTA. Para avaliação da atividade da contaminação dos recursos hídricos, foram utilizados o fígado do *G. brasiliensis*, onde foi avaliado a atividade da acetilcolinesterase, carbonilação de proteínas, espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico. O estudo apresentou que a presença de metais pesados interfere de forma significativa na produção de eritrócitos totais e formação da proteína carbonil do bioindicador. A variação da produção de TBARs e acetilcolinesterase não sofreram influencia com relação a presença dos metais no meio. Esses dados nos sugerem que alguns metais são capazes de influenciar de modo significativo na presença, distribuição e bioacumulação dos mesmos nos órgãos de bioindicadores de qualidade ambiental. Novos estudo ainda são necessários para compreender o mecanismo desses metais e seus eventuais riscos a saúde da biota.

**Palavras-chave:** Carbonilação de proteínas; Hematologia; *Geophagus brasiliensis*;

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>10</b>
1.1 MEIO AMBIENTE E AMBIENTES AQUÁTICOS .....	10
1.2 EXTRAÇÃO DE CARVÃO .....	11
1.3 METAIS PESADOS E BIOINDICADORES .....	12
1.4 OBJETIVOS.....	18
<b>1.4.1 Objetivo geral .....</b>	<b>18</b>
<b>1.1.2 Objetivos específicos .....</b>	<b>18</b>
<b>2 MATERIAS E MÉTODOS.....</b>	<b>20</b>
2.1 LOCALIZAÇÃO DA ÁREA DE ESTUDO .....	20
2.2 MODELO ANIMAL .....	21
2.3 TESTES BIOQUÍMICOS.....	22
<b>2.3.1 Atividade da acetilcolinesterase.....</b>	<b>22</b>
<b>2.3.2 Avaliação da formação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS).....</b>	<b>22</b>
<b>2.3.3 Avaliação das medidas do dano oxidativo em proteínas.....</b>	<b>23</b>
2.4 QUANTIFICAÇÃO DE ERITRÓCITOS .....	23
2.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	24
<b>3 RESULTADOS .....</b>	<b>25</b>
3.1 ATIVIDADE DA ACETILCOLINESTERASE .....	25
3.2 AVALIAÇÃO DA FORMAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS REATIVAS AO ÁCIDO TIOBARBITÚRICO (TBARS).....	25
3.4 2.3.3 AVALIAÇÃO DAS MEDIDAS DO DANO OXIDATIVO EM PROTEÍNAS.....	26
3.4 QUANTIFICAÇÃO DE ERITRÓCITOS .....	27
<b>4. DISCUSÃO .....</b>	<b>28</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>33</b>

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 MEIO AMBIENTE E AMBIENTES AQUÁTICOS

À medida que a humanidade aumenta sua capacidade tecnológica de intervir na natureza surgem os conflitos quanto ao uso do espaço, dos recursos e da disposição dos resíduos no ambiente. Como consequência da industrialização, houve a disponibilização de uma grande diversidade de produtos químicos potencialmente tóxicos e a geração de resíduos em quantidade significativamente prejudicial ao ambiente (ZAGATTO, 2006).

O aumento da atividade antrópica no planeta está intimamente associado ao crescimento da demanda energética. Esta crescente necessidade de energia faz com que maiores quantidades de combustíveis fósseis sejam exploradas e consumidas. O carvão mineral por meio da termoelectricidade e pelo uso em caldeiras industriais mostra-se como uma forma de suprimento desta carência energética (ZANCAN-FILHO, 2002). O uso do carvão como fonte energética em usinas apresenta alto potencial poluidor que se manifesta desde a mineração, o beneficiamento e, principalmente, na sua combustão (CERUTTI, 2002).

A intensificação produtiva dos últimos anos pela expansão da economia nacional, a atividade mineradora e seus processos proporcionaram um complexo dinamismo econômico, e que nestes desenvolvimentos antrópicos demonstraram uma ameaça à manutenção dos ecossistemas regionais, bem como na qualidade de vida e qualidade ambiental na região sul de Santa Catarina (MILIOLI, 1999). Dentre os impactos ambientais relacionados à mineração de carvão, o mais agravante deles certamente é a poluição dos mananciais hídricos das regiões próximas às jazidas, onde o mineral é explorado (ORTIZ, 2002).

Os corpos d'água constituem o meio receptor final dos impactos sofridos no ambiente. Esses impactos são detectados em vários níveis que vão desde alterações hidrológicas até mudanças profundas na qualidade química com reflexos na biota. Além da parte química, os sedimentos de fundo recebem, por precipitação, grande parte de carga poluente com modificações tanto na natureza física como de composição química (ALMADA, 2002).

Ambientes aquáticos são complexos e diversos, incluindo vários tipos de ecossistemas, tais como rios, riachos de água doce, lagos, estuários, águas costeiras e oceânicas, cada qual apresentando características bióticas e abióticas distintas (BUFFLE; DE VITRE, 1994).

A contaminação dos ecossistemas aquáticos vem sendo causada por um número crescente de poluentes que, uma vez despejados no ambiente, se distribuem e interagem de acordo com suas características e com as condições do meio receptor, sendo sujeitos a transformações químicas (hidrolises), físicas (fotólises) e biológicas (decomposição), podendo atingir níveis mais altos da cadeia trófica por meio da bioacumulação (BERGMAN; PUGH, 1994).

Nas últimas décadas, o aumento populacional e o consequente aumento das atividades industriais vêm contribuindo para o agravamento dos problemas ambientais, principalmente com respeito à preservação das águas superficiais e subterrâneas (TIBURTIUS; PERALTA-ZAMORA; LEAL, 2004). O significativo impacto global na saúde humana, gerada pela poluição por metais pesados são de grande interesse público (BASHA et al, 2008) uma vez que a mineração de metais pesados e fundição produz a contaminação do ar, água e solo, que pode ser transferido para biota através da cadeia alimentar (CHANEY, 1989).

## 1.2 EXTRAÇÃO DE CARVÃO

O carvão mineral é uma rocha sedimentar combustível, formada a partir de determinados vegetais que sofreram soterramento em bacias originalmente pouco profundas. Fatores como a pressão, a temperatura, a tectônica e o seu tempo de atuação, determinaram a carbonificação gradativa da matéria vegetal original, que sofreu modificações significativas com a perda de  $O_2$  e  $H_2O$  e enriquecimento em carbono (BRASIL, 1987).

No Brasil, especialmente no Rio Grande do Sul e em Santa Catarina, a combustão do carvão é uma importante fonte emissora de material particulado, e a concentração dos elementos gerados durante a queima depende da composição química do carvão original (SÁNCHEZ, 1987). A mineração de carvão a céu aberto é uma das principais formas de degradação ambiental na região sul de Santa Catarina, que são provenientes das lavras de minas e dos rejeitos de carvão

(LUNARDI NETO, 2008) que, conseqüentemente, podem gerar efluentes aos cursos d'água, através das descargas de drenagem ácida, onde geralmente, os valores de pH, podem variar na faixa entre 1,5 e 4,0 e, com elevada concentração de ferro, e além de níveis significativos de outros metais pesados (LAUS et al, 2006).

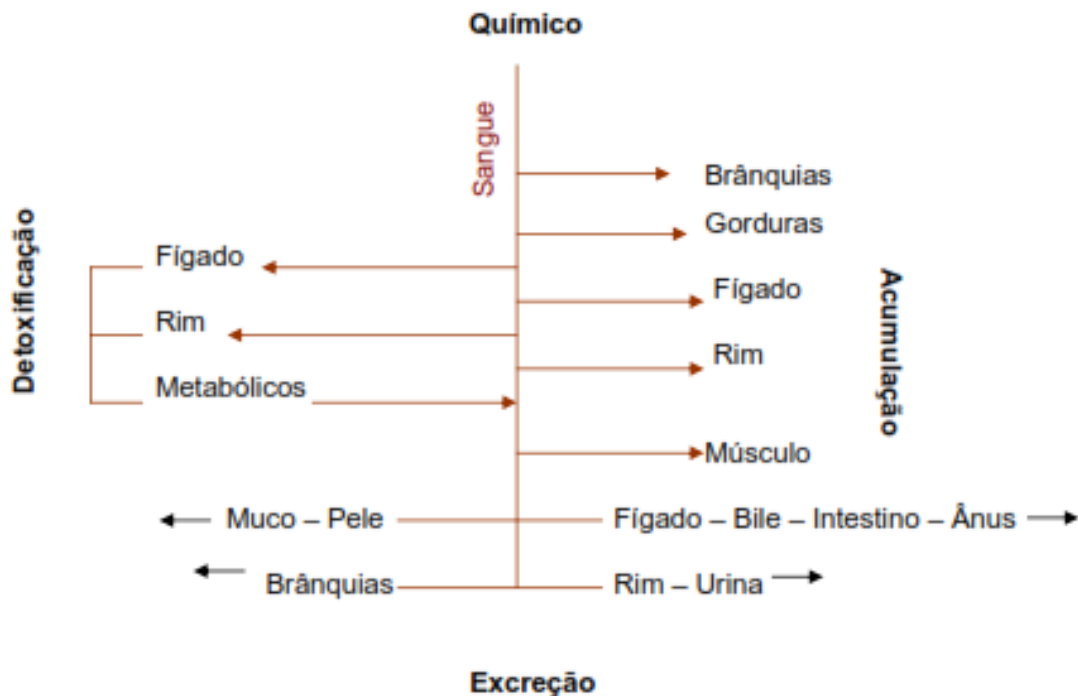
LUNARDI NETO (2008) destaca a mineração de carvão a céu aberto como uma das principais formas de degradação ambiental na região sul de Santa Catarina. Os altos níveis de acidificação resultantes da oxidação da pirita podem provocar dissolução de minerais aluminossilicatados, elevar a concentração de metais, como alumínio, ferro, manganês, cobre níquel e zinco, a níveis tóxicos, e acelerar as perdas de cálcio e magnésio (CAMPOS; ALMEIDA; SOUZA, 2003).

Em geral, a mineração provoca um conjunto de efeitos não desejados que podem ser denominados de externalidades. Algumas dessas externalidades são: alterações ambientais, conflitos de uso do solo, depreciação de imóveis circunvizinhos, geração de áreas degradadas e transtornos ao tráfego urbano (BITAR, 1997).

### 1.3 METAIS PESADOS E BIOINDICADORES

Metais no meio aquático podem ser bioacumulados por organismos ou passivamente a partir de água, ou por absorção facilitada (Figura 1). Metais essenciais são mantidos por ligação a moléculas orgânicas com uma variedade de sítios bioquímicos onde funcionam principalmente como catalisadores para induzir ou aumentar a atividade enzimática (REGAN, 1993).

Figura 1 - Diagrama esquemático das possíveis direções de movimentos e destino dos metais depois de absorvidos no sangue dos peixes (modificado de Heath, 1995).



Bioindicadores são definidos como qualquer resposta a um contaminante ambiental ao nível individual, medidos no organismo ou matriz biológica, indicando um desvio do status normal que não pode ser detectado no organismo intacto. Ou seja, são medidas de fluidos corporais, células, tecidos ou medidas realizadas sobre o organismo completo, que indicam, em termos bioquímicos, celulares, fisiológicos, compartimentais ou energéticos, a presença de substâncias contaminantes ou a magnitude da resposta do organismo alvo (ARIAS, 2002).

O estudo dos componentes biológicos em peixes tem sido utilizado como bioindicador de qualidade ambiental. Substâncias tóxicas lançadas no ambiente por ações antrópicas fazem com que estas interajam com o organismo vivo, provocando alterações que podem gerar graves desequilíbrios ecológicos (ARIAIS et al, 2007).

Relatos de diversos estudos de campo sobre bioacumulação de metais em peixes que vivem em águas poluídas mostraram que quantidades consideráveis podem ser depositadas nos tecidos dos peixes sem causar mortalidade (JEZIERKA, 2006).

Embora muitos metais sejam essenciais para a manutenção da vida, todos os metais são tóxicos em concentrações elevadas, porque causam estresse oxidativo pela formação de radicais livres (KHAYATZADEH, 2010). JOSEPH E

SRIVASTAVA (1993) realizaram um trabalho sobre concentrações de mercúrio na água, sedimentos e peixes do Ennore estuário durante o período de 1982-1983. O estudo mostrou que a absorção de mercúrio por peixe era de cerca de 400 vezes maior do que a própria água.

Metais essenciais em elevadas concentrações pode ter efeitos subletais de toxicidade para alguns organismos ou consequências letais para os outros. Além disso, os metais em concentrações deficientes podem ter efeitos adversos a saúde assim, os metais podem ter um duplo limite tóxico ao organismo (RAINBOW, 2007) A inibição da acetilcolinesterase (AChE) tem sido amplamente utilizado em animais aquáticos para diagnosticar a exposição a compostos inibidores da colinesterase (PEAKALL, 1992) A inibição da acetilcolinesterase esta documentada como um alvo de bioindicador específico para avaliação de exposição de organismos aquáticos (WESS, 1958). A inibição provoca uma acumulação de acetilcolina nas sinapses, gerando disfunção neuronal, que pode resultar na morte do organismo (PEAKALL, 1992). A inibição da AChE está diretamente ligada a mecanismos de ação tóxica de pesticidas organofosforados e carbanatos (DE LA TORRE et al, 2002, STEFANO et al, 2008). No entanto, um crescente número de estudos tem evidenciado que a atividade da AChE pode ser afetada por outras classes de pesticidas, metais pesados e outras misturas de contaminantes (LIONETTO et al, 2003; MORAES et al, 2007; FONSECA et al, 2008).

A avaliação da atividade enzimática, em bioindicadores, além de demonstrar que a exposição excessiva possui significado clínico ou toxicológico próprio, pode estar associado a um efeito ou uma disfunção do sistema biológico avaliado (AZEVEDO; CHASIN, 2003). Peixes têm demonstrado serem sensíveis a pequenos níveis de contaminantes no meio aquático (POWERS, 1989; WALKER, 1985). Recentemente, o estresse oxidativo e alguns parâmetros das defesas antioxidantes de peixes e enzimas de biotransformação de peixes e moluscos têm sido utilizados como biomarcadores de poluição da água (ADANS, et al, 1991).

Todos os organismos aeróbicos dependem do oxigênio no ambiente para produção de energia e desta forma manutenção da vida. No processo de formação de adenosina trifosfato (ATP), as moléculas de oxigênio são reduzidas a água pelos complexos que compõem a cadeia respiratória, podendo formar vários produtos do metabolismo do oxigênio chamados espécies reativas do oxigênio (EROs) (MASELLA et al, 2005; LUSCHAK, BAGNYUKOVA, 2006).

Quando os organismos são expostos a contaminantes, a produção EROs pode aumentar, prevalecer sobre sua degradação e levar a situação de estresse oxidativo (LUSCHAK, BAGNYUKOVA, 2006). LIVINGSTONE (2001) revela que muitos contaminantes aquáticos como benzeno e bromobenzeno e metais como alumínio, mercúrio, cádmio e cromo poder estimular a produção de EROs e resultar em danos oxidativos aos organismos aquáticos.

Duas perturbações bioquímicas resultantes do estresse oxidativo são a peroxidação lipídica e a formação de proteína carbonil (ALMROTH et al, 2005). No processo de peroxidação lipídica, são formados vários produtos de degradação lipídica como malondialdeído (MDA) e outros aldeídos. O MDA é bem caracterizado por ser um produto da oxidação de ácidos graxos polinsaturados podendo agir com o ácido tiobarbitúrico (TBA) produzindo um intermediário colorido (TABARS) que é usado para quantificar a peroxidação lipídica (ROMEO et al, 2000; ALMROTH et al, 2005).

O processo de peroxidação lipídica influencia a fluidez das membranas e também a integridade de biomoléculas associadas a membrana como proteínas e colesterol (ALMROTH et al, 2005), os lipídios de membrana altamente oxidados, podem atuar sobre proteínas próximas causando a formação de um excesso de proteínas carboniladas (DALLE-DONNE et al, 2003). A formação de proteínas carboniladas é um processo irreversível que causa mudanças conformacionais, decréscimo na atividade catalítica em enzimas e pode resultar na quebra de proteínas devido ao fato de estas moléculas estarem mais susceptíveis a ação de proteases (ALMROTH et al, 2005).

A investigação do conteúdo de proteína carbonil nas células é um biomarcador de estresse oxidativo muito utilizado em humanos (PARVEZ, RAISUDDIN, 2005).

O desenvolvimento de biomarcadores a partir do estudo de respostas biológicas de organismos aos poluentes tem fornecido ferramentas bioquímicas essenciais para a implementação de programas de monitoramento de contaminante exposição e/ou efeitos (MONTEIRO et al, 2005).

Órgão como gônadas, ossos e cérebro podem concentrar altos níveis de metais enquanto os músculos, em comparação com outros tecidos, apresentam níveis geralmente baixos (JEZIERSKA; WITESKA, 2006).



Os estudos sobre hematologia de peixes de clima temperado tiveram início no século passado com as observações de GULLIVER em 1845 sobre eritrócitos (ORIA, 1932). Os primeiros relatos sobre leucócitos foram mais tardios, somente nos primórdios do século passado, com as informações de Drzerwina em 1905, 1909, 1911 e de Jordan em 1926 (ELIS, 1977).

No Brasil, o estudo de variáveis hematológicas de teleósteos teve início com as observações de ORIA (1932), que descreveu características morfométricas de eritrócitos em 24 espécies de cinco famílias de teleósteos fluviais brasileiros. A partir da década de 60 tais estudos foram retornados com algumas observações em peixes marinhos (PITOMBEIRA et al, 1968; PITOMBEIRA; MARTINS, 1970).

A análise dos padrões sanguíneos fornece subsídios importantes para o auxílio do diagnóstico e prognóstico de condições de morbidade em populações de peixes (HINES; YASOUV, 1970; BLAXHALL; DAISLEY, 1973; MOISEENKO, 1998). Apesar da grande importância da hematologia ainda é escassa a informação literária sobre teleósteos. HOUSTON (1997) estima que de 50 a 100 novas contribuições são publicadas anualmente. Porém, essas contribuições tem origem em diferentes países e torna-se infinita quando se considera a diversidade biológica existente na zona intertropical onde se situa o Brasil (TAVARES-DIAS; MORAES, 2004).

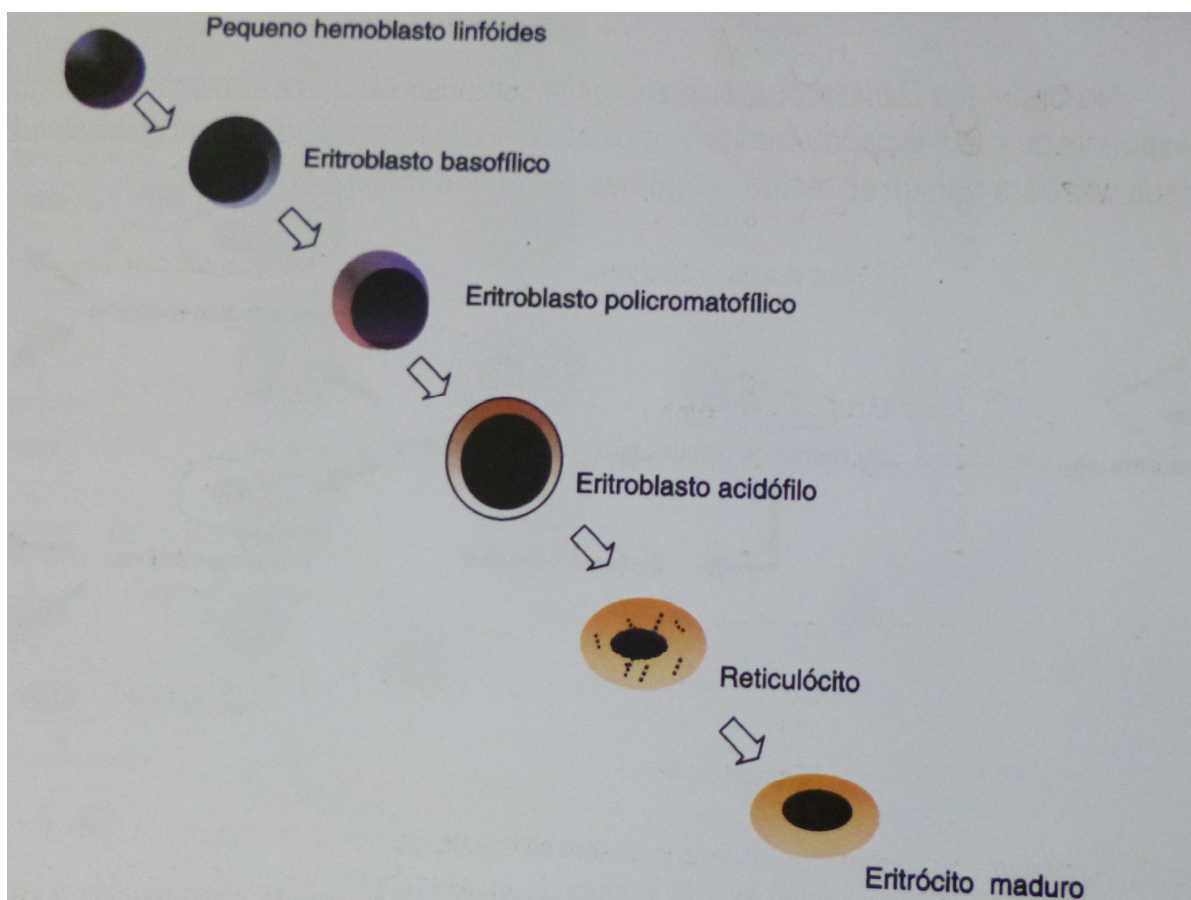
Os peixes são desprovidos de medula óssea e de linfónodos; assim os tecidos mieloides e linfoides estão, geralmente, associados no mesmo órgão, sendo o tecido linfoide de maior ou menor complexidade de acordo com a posição do peixe na escala filogenética (TAVARES-DIAS; MORAES, 2004). A hematopoiese sofre influencia de diversos fatores biológicos e ambientais (ALVAREZ-PELLITERO, PINTÓ, 1987). Alterações no meio ambiente são capazes de produzir estresse interferem na atividade hematopoiética. A água com pH alcalino induz redução do número de eritrócitos e de neutrófilos maduros no rim e no baço, enquanto hemoblastos linfóides e os reticulócitos aumentam com o grau de acidez e com o tempo de exposição (DHEER et al, 1987).

O sangue do peixes teleósteos é formado por eritrócitos, leucócitos e trombócitos, podendo ser essa a ordem de produção ou não. FIJAN (2002) estima que em um peixe de 120 g a produção diária de células sanguíneas é da ordem de  $10^{12}$ .

Os eritrócitos maduros são as células mais numerosas no sangue. A função dessas células consiste no transporte do oxigênio e do gás carbônico,

desempenhado pelo seu papel principal, a hemoglobina (TAVARES-DIAS; MORAES, 2004). O hematócrito também acompanha o aspecto evolutivo do peixe. Menores valores ocorrem em peixes mais primitivos da escala evolutiva, nos de ambiente lântico, nos sedentário e nos bentônicos. Já os maiores valores ocorrem em espécies marinhas pelágicas (LARSON et al, 1976) e ativas (RAMBHASKAR; SRINISA-RAO, 1987).

Figura 2: sumário esquemático das diversas fases de Maturação da linhagem eritrocitária em peixes teleósteos. Adaptado de MAHAJAN, BEER (1980), MAITI et al (2000) e TAVARES-DIAS; MORAES (2004).



Os estudos hematológicos das diferentes espécies de peixes são de interesse ecológico e fisiológico. Esses estudos auxiliam na compreensão da relação entre as características sanguíneas, a filogenia, a atividade física, o habitat e a adaptabilidade dos peixes ao ambiente (LARSON et al, 1976; RAMBHASKAR; SRINISA-RAO, 1987). Variações intra e interespecíficas ocorrem nas variáveis eritrocitárias de teleósteos marinhos de zona temperada (LARSON et al, 1976), da zona glacial (WELL et al, 1980) e entre teleósteos dulciaquícolas de valor econômico de zona temperada e tropical.

O *Geophagus brasiliensis* é uma espécie nativa de peixe do Brasil com escamas, da família dos Cichlidae e ordem dos Perciformes Segundo NOMURA (1984) é uma espécie omnívora que se adapta muito bem nas regiões de águas quentes e frias, sendo encontrada em quase todos os rios e lagos do Brasil.

Estudos na região de criciúma vêm demonstrando o *G. brasiliensis* como bioindicador de ambientes desestabilizados pela atividade de mineração e descarga de resíduos. No estudo realizado por SILVEIRA (2009), os dados obtidos mostraram que, mesmo esses animais sendo expostos experimentalmente a drenagem acida de mina, não houve toxicidade aguda, contudo, observaram efeitos genotóxicos nas amostras, causados possivelmente pelos contaminantes químicos da área.

Também utilizando *G. brasiliensis*, o estudo de BRUCHCHEN (2008) mostrou índices significativos de fragmentação de DNA em células sanguíneas, tendo tido observado também os danos ao fígado do animal. CONSTANTINO (2007) mostrou, ao estudar a peroxidação lipídica e carbonilação de proteína em *G. brasiliensis*, que quando expostos a ação de agrotóxicos esses animais obtiveram um aumento significativo.

Em um estudo mais recente, realizado em 2011, foram encontrados níveis elevados de alumínio, ferro, manganês e zinco em músculo de *G. brasiliensis* e em análises de sedimentos dos açudes próximos ao Rio Sangão, no município de Forquilha, Santa Catarina (DA SILVA, 2011).

## 1.4 OBJETIVOS

### 1.4.1 Objetivo geral

Avaliar o potencial do *G. brasiliensis* como bioindicador aquático ambiental em áreas que sofreram derrames de águas contaminadas por metais pesados.

### 1.1.2 Objetivos específicos

- ✓ Avaliar os níveis de acetilcolinesterase no fígado de *G. brasiliensis* como bioindicador aquático ambiental em áreas que sofreram derrames de águas contaminadas por metais pesados;

- ✓ Quantificar os níveis de hemácias no sangue de *G. brasiliensis* como bioindicador aquático ambiental em áreas que sofreram derrames de águas contaminadas por metais pesados;
- ✓ Avaliar os níveis de carbonilação de proteínas no fígado de *G. brasiliensis* como bioindicador aquático ambiental em áreas que sofreram derrames de águas contaminadas por metais pesados;
- ✓ Avaliar os níveis de TBARS no fígado de *G. brasiliensis* como bioindicador aquático ambiental em áreas que sofreram derrames de águas contaminadas por metais pesados.

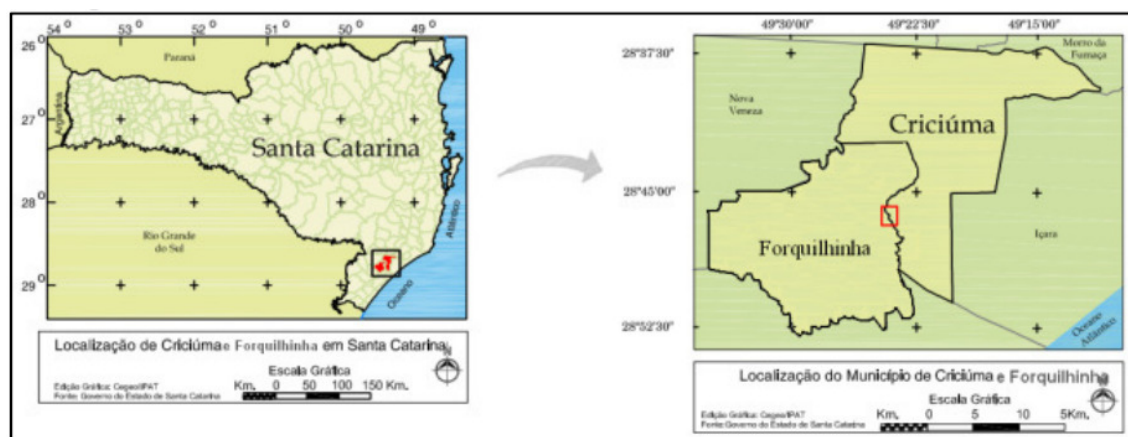
## 2 MATERIAS E MÉTODOS

### 2.1 LOCALIZAÇÃO DA ÁREA DE ESTUDO

A área destinada ao estudo baseia-se em dois corpos d'água, nas proximidades da bacia do rio Sangão, onde um dos açudes é banhado constantemente com as águas do rio Sangão (açude 1), enquanto que o outro não (açude 2). Coordenadas UTM 22 J (SAD 69) 652707 E e 6817020 N.

O rio Sangão situa-se ao sul da rodovia Gabriel Arns, próximo ao limite intermunicipal com Criciúma, na divisa com o município Forquilha, na região da AMREC, extremo sul de Santa Catarina (Fig. 3). Os açudes de onde foram realizados a coleta das amostras estão dispostos a margem direita do rio Sangão, nas terras de propriedade particular do senhor Martins Picolo, morador do bairro São José, rua São José.

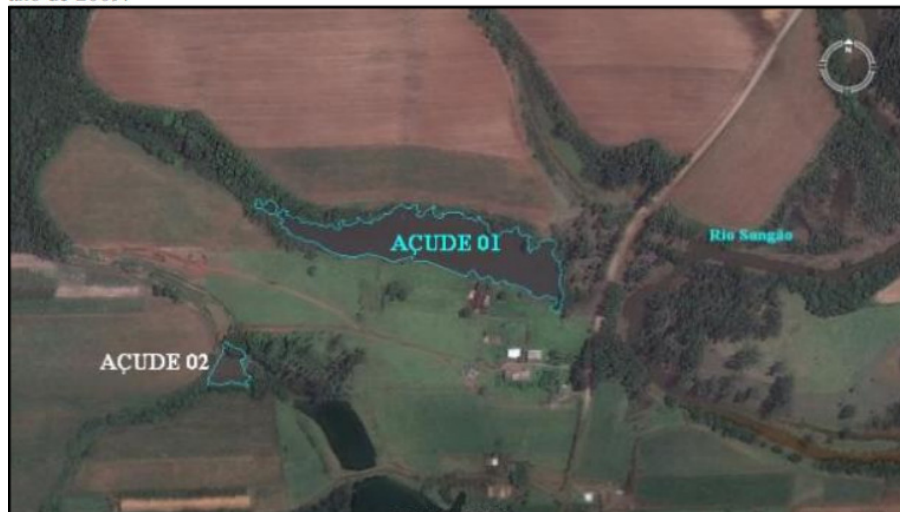
Figura 3: Localização espacial do município de Forquilha e Criciúma em Santa Catarina, bem como da região onde se encontram os dois açudes. Com base no mapa de localização do município de Criciúma. Fonte:



Fonte: CEGEO e IPAT (2007).

A Figura 4 demonstra a foto aérea da propriedade do senhor Martins e os dois açudes onde o estudo foi realizado.

Figura 4: Corpos d'água presentes na propriedade do Sr. Picolo, em imagem de satélite referente ao ano de 2009. Fonte: Google



Fonte: Google maps, 2012.

## 2.2 MODELO ANIMAL

Foram utilizados 10 animais da espécie *G. brasiliensis* (Quoy & Gaimard, 1824), organizados em dois grupos, os provenientes do açude 1, tratado como grupo experimental, e os do açude 2, tratados como grupo controle, que foram coletados no mês de abril de 2012, com  $n=5$  animais para cada grupo.

Figura 5: exemplar de *G. brasiliensis*



Messas, 2005

As capturas foram realizadas com covas, utilizando como iscas engodo, até alcançar o número 10 indivíduos. Os animais capturados, passaram por identificação

de espécie com o auxílio do Prof. M.Sc. Claudio Ricken e conforme as orientações de BRITSKY et al (1999), apenas os animais pertencentes a espécie *G. brasiliensis* permaneceram no estudo, sendo repostos a natureza animais de outras espécies.

Todos os animais foram eutanasiados por gilhotinamento após a identificação e pesagem; o fígado foi imediatamente retirado e mantido em gelo a -80° C para avaliações bioquímicas.

## 2.3 TESTES BIOQUÍMICOS

### 2.3.1 Atividade da acetilcolinesterase

Para a determinação da atividade da acetilcolinesterase foram utilizado os fígados dos animais, e sua determinação se deu pelo método de ELLMAN et al. (1961) com modificações realizadas por OLIVEIRA-SILVA e colaboradores (2000), que possibilita as amostras a ficarem congeladas e manter a estabilidade enzimática por até 7 dias. A taxa de hidrólise é medida em acetilcolina na concentração de 0,8 mM em 1 mM de tampão fosfato (pH 7,5) e 10 mM de DTNB (ácidoditinitrogenico). Cinquenta microlitros do homogeneizado foram adicionada a reação e incubada por 3 minutos. A hidrólise foi monitorada pela formação do dianion de DTNB a 412 nm de 2-3 minutos (intervalo de 30 segundos) a 25° C.

### 2.3.2 Avaliação da formação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

Como índice de peroxidação lipídica a quantidade de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico foi avaliada durante uma reação ácida aquecida, como previamente descrita (WILLS, 1965). Brevemente, as amostras obtidas foram misturadas com 1ml de ácido tricloroacético 10% e 1ml de ácido tiobarbitúrico, fervidas por 15 minutos e após a quantidade de TBARS foi determinada pela absorbância em 532 nm.

### 2.3.3 Avaliação das medidas do dano oxidativo em proteínas

A oxidação mediada pelas espécies reativas de oxigênio de alguns resíduos de aminoácidos como a lisina, arginina e prolina, leva à formação de grupos carbonil (AMICI, et al., 1989). Grupos carbonil também podem ser formados como consequência de reações secundárias de cadeias laterais de alguns aminoácidos com produtos de oxidação lipídica, ou açúcares reduzidos ou seus produtos de oxidação; (BAYES; THORPE, 1999; KRISTAL; YU, 1992).

O dano oxidativo em proteínas foi determinado pela medida de grupos carbonil conforme previamente descrito (LEVINE, et al, 1990). Brevemente, as amostras obtidas foram precipitadas e as proteínas dissolvidas com dinitrofenilidrazina. Os grupamentos carbonil foram mensurados pela absorbância em 370 nm.

## 2.4 QUANTIFICAÇÃO DE ERITRÓCITOS

As amostras foram coletas via pulção cardíaca com agulhas calibre 40x12-1.25 mm x 38 mm e armazenados em tubos do tipo *Eppendorf*, que continham de 1.0 a 2.5mg de EDTA para cada milímetro de sangue, segundo descrito por SIL e HASHIMOTO (2003). As amostras foram homogenizadas, diluídas em líquido hemolisante e posteriormente foram contadas em câmara de Neubauer espelhada do tipo *improv*. Como diluente foram utilizados ácido acético glacial 2% e/ou ácido clorídrico a 1%, os quais podem ser tingidos com violeta genciana ou azul de metileno. O sangue foi diluído 1:20 (0,4 mL de líquido diluente para 20 mL de sangue), homogenizados para que houvesse a hemólise dos eritrócitos. As técnicas de coloração seguiram as orientações de MARSHAL (1979).

Todos os procedimentos experimentais, análises bioquímicas e descarte dos animais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Uso de Animais da Universidade, sob o protocolo 33/2012. Ao término do experimento, os animais foram depositados em saco branco leitoso com identificação de contaminado e encaminhados ao biotério e armazenados em freezer até que a empresa terceirizada fizesse o descarte adequando, nesse caso, a cremação das amostras.



## 2.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

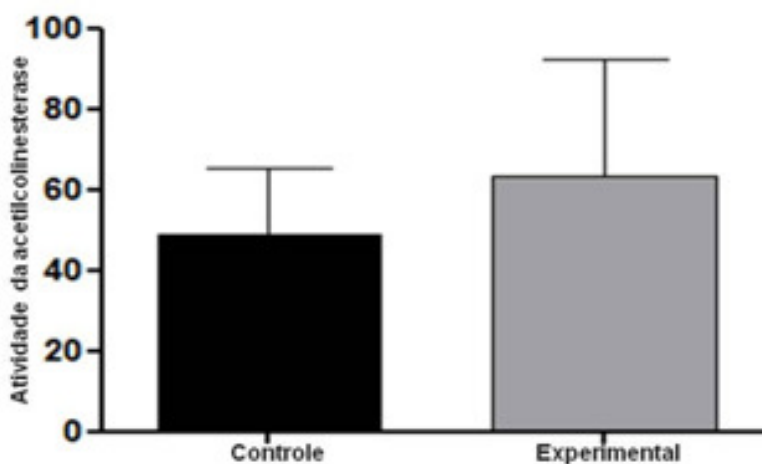
As variáveis foram mostradas por média  $\pm$  S.D. de cinco animais em cada grupo. As diferenças entre os grupos foram avaliados utilizando a análise de *T student* não pareado. Valores de  $p < 0,05$  serão considerados estatisticamente significativos.

### 3 RESULTADOS

#### 3.1 ATIVIDADE DA ACETILCOLINESTERASE

A figura 6 representa os dados obtidos na avaliação da atividade da enzima acetilcolinesterase. As análises estatísticas determinadas por *T Student*. Não obtivemos diferença significativa entre os grupos.

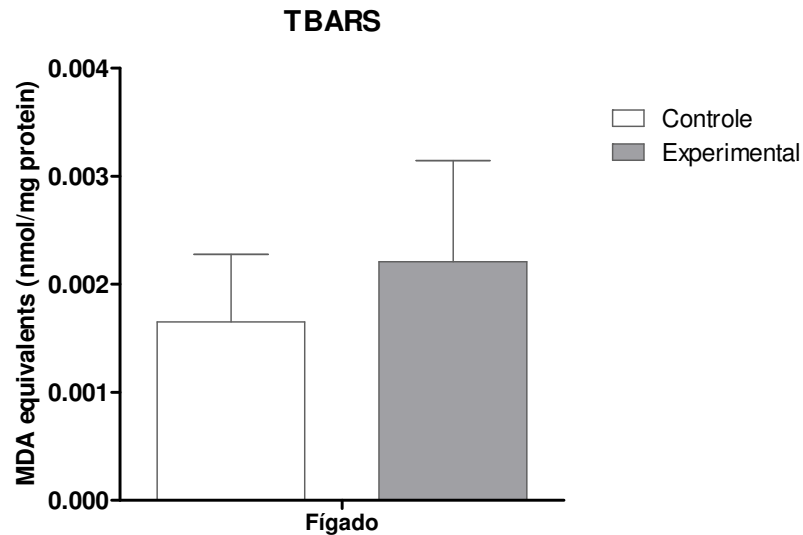
Figura 6: avaliação da atividade da enzima acetilcolinesterase. As barras representam as médias e as linhas o desvio padrão.  $p < 0,05$ . \* desvio significativo em comparação o grupo controle.



#### 3.2 AVALIAÇÃO DA FORMAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS REATIVAS AO ÁCIDO TIOBARBITÚRICO (TBARS)

A figura 7 representa o resultados obtidos na avaliação do TBARS. . As análises estatísticas determinadas por *T Student*. Não obtivemos diferença significativa entre os grupos.

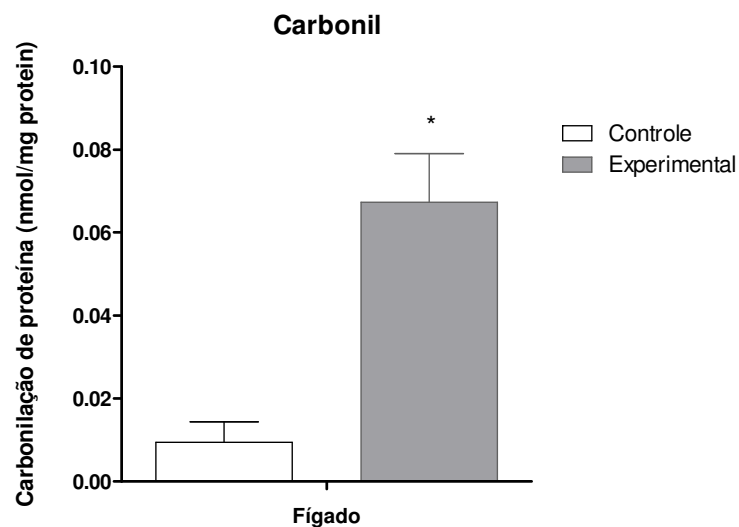
Figura 7: avaliação da da formação de espécies substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico. As barras representam as médias e as linhas o desvio padrão.  $p < 0,05$ . \* desvio significativo em comparação o grupo controle.



#### 3.4 2.3.3 AVALIAÇÃO DAS MEDIDAS DO DANO OXIDATIVO EM PROTEÍNAS

A figura 8 representa dados obtidos através da carbonilação de proteínas. As análises estatísticas determinadas por *T Student*. Foi obtido um desvio padrão maior que  $p > 0,05$ .

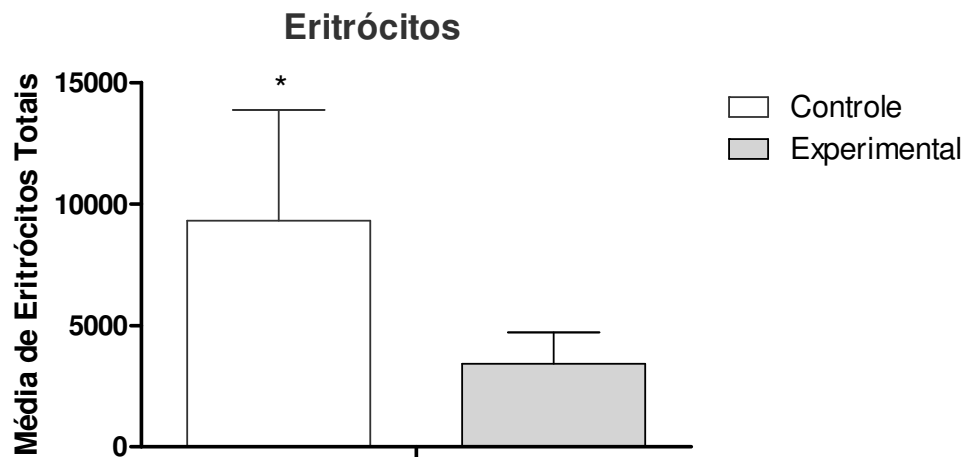
Figura 8: avaliação da carbonilação de proteínas. As barras representam as médias e as linhas o desvio padrão.  $p < 0,05$ . \* encontramos um desvio significativo em comparação o grupo controle.



### 3.4 QUANTIFICAÇÃO DE ERITRÓCITOS

A figura 9 representa valores médio obtidos na contagem de eritrócitos totais de *G. Brasiliensis*. Tendo como base o grupo controle, podemos observar que a variação de eritrócitos totais teve uma diminuição de quase 37% em comparação ao grupo controle.

Figura 9: avaliação variação dos eritrócitos totais. As barras representam as médias e as linhas o desvio padrão.  $p < 0,05$ . \* desvio significativo em comparação o grupo controle.



#### 4. DISCUSSÃO

Lagos são corpos cujas condições se deterioram mais rapidamente pelas atividades humanas em comparação com os rios. Uma das ameaças mais importantes para lagos devido a atividades humanas é a poluição por metais pesados e outras substâncias tóxicas (GURCU et al, 2010). Vários metais são depositados no corpo do peixe em diferentes quantidades. Essas diferenças resultam da afinidade dos metais aos tecidos, da disposição, da absorção e das taxas de excreção do peixe (JEZIERSKA; WITESKA, 2001). De acordo com KOCKE (1996), os níveis de cádmio e chumbo em fígado e rim de *Salvelinus alpinus* indicam maiores taxas de absorção dos metais no verão, quando a temperatura da água foi mais elevada.

Interações entre vários metais podem estar relacionados com suas diferentes afinidades para diferentes órgãos (JEZIERSKA; WITESKA, 2001). No estudo realizado por SILVA (2011), os níveis de manganês, ferro, alumínio, zinco foram considerados de maior interesse, contando que o somatório de quociente de risco por elemento, foi considerado alto para a área estudada. A comparação dos dados sobre os níveis de metais em peixes de vários lagos indica que as concentrações de Cádmio, Chumbo e Zinco são mais elevadas em peixes de lagos acidificados (GRIEB, 1999; HAINI, 1994; WIENER, 1990; HOREL, 1995).

Dados apresentados por CANLI e ATLI (2003), mostram que as médias de concentrações de metais essenciais e não essenciais nas brânquias, fígado e músculos de cada espécie de peixe apresentam grandes variações, bem como de peixes de diferentes áreas estudadas. Suportando a ideia de que as diferenças nos resultados apresentadas por SILVA em 2011 e os apresentados nesse trabalho, levam em consideração as estações do ano de coleta, ao tempo de exposição que os animais tiveram aos metais e a vida útil e vias de excreção metabólica de cada animal, nossos resultados da atividade da acetilcolinesterase (Figura 6) indicam que pode haver uma diferença na atividade da acetilcolinesterase na comparação dos grupos, contudo, estatisticamente, essa diferença, não foi apontada.

Vários estudos recentes têm indicado que a enzima acetilcolinesterase é sensível a outros tipos de contaminantes ambientais, tais como pesticidas, detergentes e misturas de complexos de poluentes (GILL et al, 1990, PAYNE et al, 1996)

Ao estudar a atividade da AChE em duas espécies de peixes, *Cnesterodon decemmaculatus* e *C. carpio*, em dois sítios experimentais em um rio na Argentina, DE LA TORRE et al (2002) verificaram alterações na atividade enzimática. A inibição da AChE nesse estudo foi atribuída a presença de altas concentrações de metais pesados encontrados na água.

Quaisquer alterações na qualidade da água são rapidamente refletidas na estrutura das guelras e função das brânquias, uma vez que as brânquias são continuamente expostas à água do ambiente. Brânquias são os sítios primários de troca gasosa. O epitélio branquial consiste principalmente em três tipos de células: as células de pavimento ou respiratória, as células mucosas e células cloreto (LAURENT, PERRY, 1995).

A primeira interação dos metais ocorre em membranas celulares, causando possivelmente algumas perturbações nos mecanismos de transporte. Em segundo lugar, os metais causam danos a níveis subcelulares (WILSON, FREEBERG, 1980). Além disso, os metais pesados tóxicos podem resultar em lesão para as células, as quais podem morrer por necrose e/ou apoptose em resposta às condições moderadamente adversas, enquanto a exposição a condições severas, irá resultar em necrose (WYLLIE, KERR, 2003).

As concentrações de metais pesados em tecidos de peixes de diferentes regiões também apresentam grandes variações (CANLI; ATLI, 2003). KIDWILL e colaboradores (1995) observaram que espécies de peixes predadores continham mais mercúrio, e que peixes bentônicos continham mais cádmio e zinco. A maior parte das cargas totais de metais acumuladas nos músculos está associada à afinidade do músculo ao metal (CANLI; ATLI, 2003). Tem sido sugerido que o metabolismo dos peixes tem desempenhado um papel importante na acumulação de metais pesados em animais marinhos (DOUBEN, 1989).

NEY e VAN HASSOL (1983) descobriram que as concentrações de chumbo e zinco foram maiores em peixes bentônicos. Os resultados da pesquisa de BAGUM (2009) em dez espécies diferentes de peixes mostraram que maiores concentrações de metais pesados se encontram nos rins e fígados. O fígado acumula concentrações elevadas de metais, independente da rota de absorção. O fígado é considerado um bom monitor de poluição da água, as concentrações de metais encontrados nesse órgão geralmente são proporcionais aos presentes no meio (JEZIERSKA; WITESKA, 2006).

Diversos estudos têm verificado alterações nos níveis de TBARS em peixes expostos a contaminantes ambientais. GIODA et al (2007) encontraram aumento de de TBARS em cérebro, fígado e músculo de *Leporinus obtusidens* expostos experimentalmente a zinco por 45 dias, contudo, quando expostos a cobre, os níveis de TBARS cerebral e hepático reduziram.

Nossos resultados (figura 7) , mostraram que *G. brasiliensis*, expostos a alumínio, cádmio, zinco e manganês, não tiveram aumento significativo na alteração dos níveis de TBARS. Os peixes podem excretar, até certo ponto, determinados metais como o cádmio e o zinco. As diferentes rotas de excreção incluem as brânquias, pele, muco, fígado, rim e fezes (HEATH, 1995).

Segundo SPRAGUE (1990), vários metais interferem diretamente na toxicidade dos agentes poluentes, entre os quais destacam-se: 1) o pH, principalmente para substancias que se ionizam; 2) a dureza da água, que determina mudanças no efeito poluente dos metais; 3) o material orgânico dissolvido na água, que pode se ligar aos elementos-traço e diminuir o efeito tóxico dos mesmos e 4) estágios nutricionais dos animais, que podem ser responsáveis por inexplicáveis variações na suscetibilidade a poluentes.

Peixes acumulam metais pesados em seus tecidos em concentrações maiores as encontradas no ambiente. As principais formas de captação de metais são via ingestão de alimento contaminado ou por absorção branquial (ALQUEZAR et al, 2006; SOARES et al, 2008).

Os metais acumulam-se em tecidos metabolicamente ativos como rim, fígado, brânquias e trato digestivo (SOARES et al 2008). Em um experimento conduzido por CINIER et al (1999), verificou-se o potencial de acumulação e eliminação de cádmio em tecidos de *C. carpio*. A concentração de cádmio no fígado e rim aumentou de acordo com as concentrações do metal na água. De acordo com o mesmo autor, a exposição ao cádmio resulta em significativa captação de metal pelos órgão. Fígado e rim parecem ser os órgão mais importante na captação de cadmio

Em um estudo realizado por PARVEZ e RAIZUDDIN (2005) em peixes expostos a pesticidas como Deltametrin, Endosulfan e Paraquat, houve um aumento significativo da proteína carbonil nas brânquias, rim e fígado. É sugerido que a carbonilação de proteínas ocorreu em função de estresse oxidativo provocado pela exposição dos peixes aos metais pesados (ALMROTH et al, 2008).

Nossos resultados mostram que a exposição a metais pesados leva a um aumento na carbonilação de proteínas, e que isso pode estar relacionado ainda a presença de cádmio, que é facilmente bioacumulado no fígado de peixes. Desta forma, a presença de metais pesados no ecossistema aquático pode afetar os organismos, resultando em alterações fisiológicas e bioquímicas (PRETTO, 2008).

Os peixes constituem um dos produtos finais dos sistemas aquáticos (BRANCO, 1983) e por tanto, são reconhecidos como organismos indicadores de possível poluição dos corpos de água (BRANCO, 1983; LINDE et al, 1998).

Sob condições de estresse, como no caso de exposições a metais, podem ocorrer mudanças na taxa de síntese de eritrócitos, o que pode ter um considerável efeito sobre o transporte de gás, mesmo quando o hematócrito permanece normal (HEATH, 1995). Também, são observados, frequentemente, aumentos nas concentrações de glicose e lactato no plasma de peixes expostos a ambientes poluídos (SANTOS, PACHECO, 1996).

Nossos resultados com relação a hematologia dos teleósteos, mostraram que no grupo experimental houve uma diminuição de quase 37% na produção dos eritrócitos totais em comparação aos animais que estavam no grupo controle. A acumulação de metais em vários órgãos dos peixes pode causar lesões estruturais e distúrbios funcionais os mesmos (JEZIERSKA; WITESKA, 2006).

Distúrbios no comportamento, na regulação iônica, nos parâmetros hematológicos e danos histopatológicos entre outros são frequentemente observados em peixes expostos a metais pesados (HEATH, 1995).

A denominação de uma espécie bioindicadora de contaminação requer muita cautela, pois fatores como pH, temperatura, oxigênio dissolvido, dureza, estado nutricional dos indivíduos, entre outros (SPRAGUE, 1990) devem ser levados em consideração para avaliar a toxicidade de um metal e somente assim inferir se uma determinada espécie é mais sensível que outra (PRETTO, 2008).

A extensão de bioacumulação de metais é dependente da quantidade total, a biodisponibilidade de cada metal no meio ambiente e da via de absorção de armazenamento, e os mecanismos de excreção. As exigências de organismos diferentes para metais essenciais variar substancialmente, mas faixas de concentração ideais são estreitas e frequentemente sob controle homeostático cuidado (JEZIERSKA; WITESKA, 2006).



Estudos laboratoriais de BRUCHCHEN (2008) bem como de campo de SILVEIRA (2009) e CONSTANTINO (2007), mostraram que, a utilização do *G. brasiliensis* como bioindicador de ambientes modificados é de total confiabilidade.

Os resultados aqui expressos, embasados no estudo realizado previamente por SILVA (2011), mostraram que, mesmo sobre fatores ambientais diversos, o *G. brasiliensis* apresenta-se um bom indicador de qualidade da água com relação a presença de metais pesados e sua toxicidade, mostrando ainda que o uso de apenas um parâmetro avaliativo torna-se falho para obtenção de resultados mais concretos. Novos estudos ainda são necessários para compreender a interação dos metais em organismos aquáticos, mostrando sua distribuição, acumulação e biotransformação no meio biótico e abiótico da região em que se engloba.

## REFERÊNCIAS

- ADAMS, S. M.; SHEPARD, K. L.; GREELEY JR, M. S.; JIMENEZ, B. D.; RYON, M. G.; SHUGART, L. R.; MCCARTHY, J. F.; HINTON, D. E. The use of bioindicators for assessing the effects of pollutant stress on fish. **Mar Environ Res**, v. 28, n. 1–4, p. 459-464, 1989.
- ALMADA, C. M. W.; WURDIG, N. L. **Avaliação da fauna bentônica em ambiente aquático**. Porto Alegre: FEPAM, 2002.
- ALMROTH, B.C; STURVE, J.; BERGLUND, A.; FORLIN, L. Oxidative damage in eelpout( *Zoarces viviparous*) measures as protein carbonyls and TBARS, as biomarkers. **Aquat toxicol**, v. 73, p. 171-180, 2005.
- ALMROTH, B.C; STURVE, J.; STEPHENSEN, E.; HOLTH, T.F.; FORLIN, L. Protein carbonyls and antioxidant defenses in coralwing wrasse (*Symphodus melops*) from a heavy metal polluted and a PAH polluted site. **Mar Environ Res**, v. 66. P. 271-277, 2008.
- ALQUEZAR, R.; MARKICH, S.J.; BOOTH, D.J. Effects of metals on condition and reproductive output of the smooth toadfish in Sydney estuaries, south-eastern Australia. **Environ Pollut**, v. 142; p. 123-131, 2006.
- ALVAREZ-PELLITERO, P.; PINTÓ, R. M. Some blood parameters in sea bass, *Dicentrarchus labrax*, infected by bacteria, virus and parasites. **J. Fish Biology**, v. 37, p. 259-261, 1987.
- AMICI, A.; LEVINE, R. L.; TSAI, L.; STADTMAN, E. R. Conversion of amino acid residues in proteins and amino acid homopolymers to carbonyl derivatives by metal-catalyzed oxidation reactions. **J Biol Chem**, v. 264, n. 6, p. 3341-3346, 1989.
- ARIAS, A. R. L.; BUSS, D. F.; ALBURQUERQUE, C. D.; INÁCIO, A. F.; FREIRE, M. M.; EGLER, M.; MUGNAI, R.; BAPTISTA, D. F. Utilização de bioindicadores na avaliação de impacto e no monitoramento da contaminação de rios e córregos por agrotóxicos. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 12, p. 61-72, 2007.
- ARIAS, A.R.L.; VIANA, T.A.P.; INÁCIO, A.F. **Utilização de Bioindicadores como ferramentas de monitoramento e avaliação ambiental: o caso de recursos hídricos**. Manguinhos: 2002. Disponível em [www.ebape.fgv.br/radma/doc/FET/FET020.pdf](http://www.ebape.fgv.br/radma/doc/FET/FET020.pdf). Acesso em: 24 de mar. 2013.
- BAGNASCO, M.; CAMOIRANO, A.; DE FLORA, S.; MELODIA, F.; ARILLO, A. Enhanced liver metabolism of mutagens and carcinogens in fish living in polluted seawater. **Mutat Res**, v. 262, n. 2, p. 129-137 1991
- BASHA, A. C.; BHADRINARAYANA, N. S.; ANANTHARAMAN, N.; MEERA SHERIFFA BEGUM, K. M. Heavy metal removal from copper smelting effluent using electrochemical cylindrical flow reactor. **J Hazard Mater**, v. 152, n. 1, p. 71-78, 2008.

BAYNES, J. W.; THORPE, S. R. Role of oxidative stress in diabetic complications: a new perspective on an old paradigm. **Diabetes**, v. 48, n. 1, p. 1-9, 1999.

BEGUM, A.; HARIKRISHNA, S.; KHAN, I. Analysis of Heavy metals in Water; Sediments and Fish samples of Madivala Lakes of Bangalore; Karnataka. **International Journal of ChemTech Research**, v.1, n. 2, p. 245-249, 2009.

BERGMAN, L.; PUGH, D. M. **Environmental Toxicology, Economics, and Institutions: The Atrazine Case Study**. Kluwer, 1994.181p.

BITAR, O. Y. **Avaliação da recuperação de áreas degradadas por mineração na região metropolitana de São Paulo**. 1997. 193 f. Tese de Doutorado: em Engenharia Mineral) Universidade de São Paulo, Escola Politécnica, 1997.

BLAXHALL, P. C.; DAISLEY, K. W. Routine hematological methods for use with fish blood. **J. Fish Biology**, v.5, p. 771-781, 1973.

BRASIL. **Perfil analítico do carvão**, Departamento Nacional da Produção Mineral. 6ª Boletim Técnico. Porto Alegre: 140 p. 1987.

BRITSKY, H. A.; SILIMON, K. S.; LOPES, B. S. **Peixes do Pantanal**: Manual de identificação. Brasília: Embrapa, 1999.

BRUCHCHEN, L. M. **Qualidade do Rio Criciúma, Santa Catarina, através da avaliação de toxicidade e genotoxicidade, utilizando artemia sp. e *Geophagus brasiliensis* (QUOY; GAYMARD, 1824) como bioindicadores**. 2008. 87 f. TCC (Ciências Biológicas) - Universidade do Extremo Sul Catarinense, 2008

BUFFLE, J.; DE VITRE, R. R. Chemical Nad Biological Regulation of Aquatic Systems. **Lewis Publ.**, 1994, 385p.

CAMPOS, M. L.; ALMEIDA, J. A.; SOUZA, L. S. Avaliação de três áreas de solo construído após mineração de carvão a céu aberto em Lauro Müller, Santa Catarina. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 27, p. 1123-1137, 2003.

CANLI, M.; ATLI, G. The relationships between heavy metal (Cd; Cr; Cu; Fe; Pb; Zn) levels and the size of six Mediterranean fish species. **Environmental Pollution** n. 121; v. 1; p;129-136; 2003.

CERUTTI, P. F.; FLORES, F. E. V. **Bioindicação de contaminação atmosférica decorrente do uso do carvão**. Porto Alegre: FEPAM, 2002. 667-672.

CHANEY, R. L. Toxic Element Accumulation in Soils and Crops: Protecting Soil Fertility and Agricultural Food-Chains. In: BAR-YOSEF, B.;BARROW, N. J., et al (Ed.). **Inorganic Contaminants in the Vadose Zone**: Springer Berlin Heidelberg, v.74, 1989. cap. 10, p.140-158.

CONSTANTINO, L. **Avaliação do estresse oxidativo em peixes *Geophagus brasiliensis* expostos a agrotóxicos em cultura de arroz irrigado, no município**

de Araranguá, SC. 2007. 39 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) – Universidade do Extremo Sul Catarinense, Criciúma.

DA SILVA, T. L. C. **Avaliação de risco à saúde humana considerando os metais presentes em corpos d'água situados na proximidades do rio Sangão, Forquilha, SC.** . 2011. 215 f. Trabalho de Conclusão de Curso ( Engenharia Ambiental), Universidade do Extremo Sul Catarinense, Santa Catarina, 2011.

DALLE-CONNE, I.; ROSSI, R.; GIUSTARINI, D.; MILZANI, A.; COLOMBO, R. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. **Clin Chim Acta**, v. 329, p. 23-38, 2003.

DE AZEVEDO, F.A.; DA MATTA CHASIN, A.A. 2003. **Metais; Gerenciamento da Toxicidade.** Ed.Atheneu, 554 p.

DE LA TORRE, F.R.; SALIBIÁN, A. Freshwater pollution biimarker: response of brain acetylcholinesterase activity in two fish species. **Comp iochem Phisiol C**, v. 313, p. 271-280,2001.

DE OLIVEIRA SILVA, S.; XIMENES, V. F.; CATALANI, L. H.; CAMPA, A. Myeloperoxidase-Catalyzed Oxidation of Melatonin by Activated Neutrophils. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 279, n. 2, p. 657-662, 2000.

DOUBEN, P.E. Metabolic rate and uptake and loss of cadmium from food by the fish *Noemacheilus barbatulus* L. (stone loach). *Environ Pollut*, v. 59, n. 3, p. 177-202,1989.

ELLIS, A. E. Leucocytes and relates calls in the plaice, *Pleuronectes platessa*. **J. Fish Biology**, v. 11, p. 453-491, 1977.

ELLMAN, G. L.; COURTNEY, K. D.; ANDRES, V., JR.; FEATHER-STONE, R. M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochem Pharmacol.**, v. 7, p. 88-95, 1961.

FIJAN, N. Morphogenesis of blood cell lineages in channel catfish. **Journal Fish Biology**, v. 60, p. 999-1014, 2002.

FONSECA, M.B.; GLUSCZAK, L.; MORAES, B.S.; MENEZES, C.C. PRETTO, A.; TIerno, M.A.; ZANELLA, R.; GONÁLVES, F.F.; LORO, V.L. The 2,4-D herbicide effects on acetylcholinesterase activity and metabolic parameters of piava freshwater fish (*Leporinus obtusidens*). **Ecotoxil Environ Safety**, v.69, p. 416-420,2008.

GILL, T.S.; TEWARI, H.; PANDE, J. Use of fish enzyme system in monitoring water quality: effects of mercury on tissue enzymes. **Comp Biochem Physiol**, v. 97C, p. 287-292, 1990.

GIODA, C.R.; LISSNER, L.A.; PRETTO, A.; ROCHA, J.B.T.; SCHETINGER, M.R.C.; NETO, J.R.; MORSCH, V.M.; LORO, V.L. Exposure to sublethal concentrations of Zn

(II) and Cu (II) changes biochemical parameters in *Leporinus obtusidens*. **Chemosphere**, v.69, p. 170-175, 2007.

GRIEB, T., M.; DRISCOLL, C. T.; GLOSS, S. P.; SCHOFIELD, C. L.; BOWIE, G. L.; PORCELLA D. B. Factors affecting mercury accumulation in fish in the upper Michigan Peninsula; **Environ Toxicol Chem**, v. 9, p. 919-930, 1990.

GURCU, B; YILDIZ, S; KOCA, Y.B.G. Investigation of histopathological and cytogenetic effects of heavy metal pollution on *Cyprinus carpio* (Linnaeus, 1758) in the Golmarmara Lake, Turkey, **J anim Vet Adv**, n. 9, v. 4, p. 798-808, 2010.

HAINES; T. A.; BRUMBAUGH; W. G. Metal concentration in the gill; gastrointestinal tract; and carcass of white suckers (*Catostomus commersoni*) in relation to lake acidity. **Water; Air Soil Pollut**, v. 73, p. 265-274, 1994.

HEATH; A.G.1995. **Water pollution and fish physiology**. 2.ed. CRC Press; Lewis publishers. 342p.

HINES, R.; YASHOUV, A. Differential leukocyte counts and total leukocyte and erythrocyte counts for same normal Israeli mirror carp. Israeli. **J. Aquac.- Bamidgah**, n. 22, p. 106-113, 1970.

HORWITZ; R. J.; RUPPEL; B.; WISNIEWSKI; S.; KIRY; P.; HERMANSON; M.; GILMOUR; C. Mercury concentrations in freshwater fishes in New Jersey. **Water Air Soil Pollut**. v. 80, p. 885-888, 1995.

HOUSTON, A. H. Review: Are the classical hematological variables acceptable indicators of fish health? **Trans. Am. Fish. Soc.**, v. 126, n. 6, p. 978-994, 1997.

JEZIERKA, B., WITESKA, M. The metal uptake and accumulation in fish living in polluted waters. In: TWARDOWSKA, I.; ALLEN, H. E., et al (Ed.). **Soil and Water monitoring, protection and remediation**: Springer, v.69, 2006. p.107-113.

JEZIERSKA, B.; WITESKA, M., 2001, **Metal Toxicity to Fish**, Wydawnictwo Akademii Podlaskiej, Siedlce 318 p., 2001.

JOSEPH, K. O.; SRIVASTAVA. J. P.. Mercury in the Ennore estuary and in fish from Madras coastal waters. **J. Environ. Biol.**, v. 14, p. 55-62, 1993.

KHAYATZADEH, J. A., E. **The effects of heavy metal on aquatic animals**. The 1<sup>st</sup> International Applied Geological Congress. Iran 2010.

KOCK, G.; TRIENDL, M.; HOFER, R. Seasonal patterns of metal accumulation in Arctic char (*Salvelinus alpinus*) from an oligotrophic Alpine lake related to temperature, **Can J Fish Aquat Sci**, v. 53, p. 780-786, 1996.

KRISTAL, B. S.; YU, B. P. An emerging hypothesis: synergistic induction of aging by free radicals and Maillard reactions. **J. Gerontol.**, v. 47, n. 4, p. 107-114, 1992.

LARSON, A.; JOHANSSON- SJOBECK, M. J.; FANGE, R. Comparative study of some haematological and biochemical blood parameters in fishs from the Skagerrak. **J. of Fish Biology**, v. 9, p. 425-440, 1976.

LAURENT, P.; PERRY, S.F. 1995. **Morphological basis of acid–base and ionic regulation in fish**. In: Heisler; N. (Ed.); Advances in Comparative and Environmental Physiology. Mechanisms of Systemic Regulation: Acid–Base Regulation Ion Transfer and Metabolism. Springer; Heidelberg, 91-118p.

LAUS, R.; LARANJEIRA, M. C. M.; MARTINS, A. O.; FÁVERE, V. T.; PEDROSA, R. C.; BENASSI, J. C.; GEREMIAS, R. Microesferas de quitosana reticuladas com tripolifosfato utilizadas para remoção da acidez, ferro(III) e manganês(II) de águas contaminadas pela mineração de carvão. **Química Nova**, v. 29, p. 34-39, 2006.

LEVINE, R. L.; GARLAND, D.; OLIVER, C. N.; AMICI, A.; CLIMENT, I.; LENZ, A. G.; AHN, B. W.; SHALTIEL, S.; STADTMAN, E. R. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. **Methods Enzymol**, v. 186, p. 464-478, 1990. ISSN

LIONETTO, M.G.; CARICATO, R.; GIODANO, M.E.; PASCARIELLO, M.F.; MARINOSCI, L.; SCHETTINO, T. Integrated use biomarkers (acetylcholinesterase and antioxidant enzymes activities) in *Mytilus galloprovincialis* and *mullus barbatus* in an Italian coastal marine area. **Marine Poll Bull**, v. 46, p. 324-330, 2003.

LUNARDI NETO, A. A., JACKSON, A.; DE ALMEIDA, J. A.; MAFRA, Á. L.; MEDEIROS, J. C.; ALBERTON, A.. Atributos físicos do solo em área de mineração de carvão influenciados pela correção da acidez, adubação orgânica e revegetação. **Rev. Bras. Ciênc. Solo** v. 32, n. 4, p. 1379-1388, 2008.

LUSHCHAK, V.I.; BAGNYUKOVA, T.V. effects of different environmental oxygen levels on free radical processes in fish. **Comp Biochem Physiol B**, v.144, p. 283-289, 2006.

MALABARBA, L.R.; NETO, P.C.; BERTACO, V.; CARVALHO, T.P.; SANTOS, J.F.; ARTIOLO, L. G. S.. **Guia de identificação dos peixes da Bacia do Rio Tramandaí**. Porto Alegre: Via Sapiens, 2013. 140 p.

MARSHALL, P. N. Romanowsky staining: state of the art and “ideal” techniques. in: Koopke Ja, Differential Leukocyte Counting. Skokie, il. **American College of Pathologists**, p. 205-216, 1979.

MASELLA, R.; DI BENEDETTO, R.; VARÌ, R.; FILESI, C.; GIOVANNINI, C. Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems> involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. **J Nutr Biochem**, v. 16, p. 577-568, 2005.

MILIOLI, GERALDO. **Abordagem Ecosistêmica para a Mineração: uma perspectiva comparativa para Brasil e Canadá**. 1999. 403 f. Tese de Doutorado: em Engenharia de Produção, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 1999.

MOISEENKO, T. I. Hematological indices of fishes in the evaluation of their toxicoses with reference to *Coregonus lavaretus*. **J. Ichthyology**, v. 38, n. 4, p. 315-324, 1998

MONTEIRO, M.; QUINTANEIRO, C.; MORGADO, F.; SOARES, A.M.; GUILHERMINO, L. Characterization of the cholinesterases present in head tissues of the estuarine fish *Pomatoschistus microps*: application to biomonitoring. **Ecotoxicol Environ Saf**, v. 62, n. 3, p. 341-347, 2005

MORAES, B.S.; LORO, V.L.; GLUSCZAK, L.; PRETTO, A.; MENEZES, C.; MARCHESAN, E.; MACHADO, S.O. Effects of four Rice herbicides on some metabolic and toxicology parameters of teleost fish (*Leporinus obtusidens*). **Chemosphere**, v. 68, p. 1597-1601, 2007.

NOMURA, H. **Dicionário dos Peixes**. Brasília: 1984. 23p.

OLIVEIRA-SILVA, J. J.; ALVES, S. R.; INÁCIO, A. F.; MEYER, A.; SARCINELLI, P. N.; FERREIRA, M. F.; CUNHA, J. C.; MOREIRA, J. C. Cholinesterase activities determination in frozen blood samples: an improvement to the occupational monitoring in developing countries. **Human Experimental Toxicology**, v.19, n. 3, p. 173-177, 2000.

ORIA, J. Elementos figurados do sangue de alguns teleósteos fluviais brasileiros (Nematognathas, Characidaeos, Gymnotideos, Poeciliideos).I. Eritrócitos: Formas normais, formas jovens e formas involuídas. **Anais da Faculdade Medica de São Paulo**, v. 8, p. 43-68, 1932.

ORTIZ, L.; TEIXEIRA, E. C.. **Meio Ambiente e Carvão: Impactos da exploração e utilização**. 2002.

PARVEZ, S.; RAISUDDIN, S. Protein carbonyls: novel biomarkers of exposure to oxidative stress-inducing pesticides in freshwater fish *Chann punctata* (Bloch). **Environ Toxil Pharmacol**, v.20, p. 112-117, 2005.

PAYNE, J.F.; MATHIEU, A.; MELVIN, W.; FANCEY, L.L. Acetylcholinesterase; an old biomarker with a new future? Field trials in association with two urban rivers and a paper mill in Newfoundland. **Mar Pollut Bull**, v. 32, p. 225-231, 1996.

PEAKALL; D.; 1992. **Animal biomarkers as pollution indicators**; first ed. Chapman & Hall; London, 21 p.

PELGROM, S. M. G. J.; LAMERS, L. P. M.; LOCK, R. A. C.; BALM, P. H. M.; WENDELAAR BONGA, S. E. Interactions between copper and cadmium modify metal organ distribution in mature tilapia, *Oreochromis mossambicus*, **Environ Pollut**, v. 90, p. 415-423, 1995.

PITOMBEIRA, M. S.; GOMES, F. V. B.; MARTISN, J.M. Hematological data of the fishes of the genus *Mugil Lennaeus*. **Arquivos de Ciência do Mar**, v. 9, n. 2, p. 163-166, 1969.

PITOMBEIRA, M. S.; MARTISN, J.M. Hematologigy of the Spanish mackerel. **Copeia**, v. 1, p. 182-186, 1970.

POWERS, D. A. Fish as model systems. **Science**, v. 246, p. 352-358, 1989.

PRETTO, A. **Parâmetros toxicológicos em jundiás (*Rhamdia quelen*) expostos ao cádmio**. 2008. 117 f. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2008.

RAINBOW, P. S. Trace metal bioaccumulation: models, metabolic availability and toxicity. **Environ Int**, v. 33, n. 4, p. 576-582, 2007. I

RANZINE-PAIVA, M. J. T.; FELIZARDO, N. N.; LOQUE, J. L. Parasitological and hematological analysis in Nile Tilápia *Oreochromis niloticus lunnaeus* 1757 from Guarapiranga Reservoir São Paulo State, Brasil. **Acta Scientiarum**, v. 27, p. 231-237, 2005.

REGAN, L. The Design of Metal-Binding Sites in Proteins. **Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure**, v. 22, n. 1, p. 257-281, 1993.

ROMÉO, M.; BENNANI, N.; GNASSIA-BARELLI, M.; LAFAURIE, M.; GIRARD, J.P. Cadmium and copper display different responses towards oxidative stress in the kidney of the sea bass *Dicentrarchus labrax*. **Aquatic Toxicol**, n. 48, p. 185-194, 2000.

SÁNCHEZ, D. C., J. **Emissao do elementos-traços provenientes da combustao de carvao em caldeira de grande porte**. 1987. 146 f. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1987.

SARNOWSKI, P.; JEZIERSKA B. A new coefficient for evaluation of condition of fish. **Electronic Journal of Ichthyology**, v. 2; p. 69-76, 2007.

SILVEIRA, F. Z. **Avaliação do potencial de atividade tóxica e genotóxica da drenagem ácida de mina através de ensaios ecotoxicológicos**. 2009. 54 f. TCC (Curso de Ciências Biológicas) - Universidade do Extremo Sul Catarinense, Criciúma, 2009.

SOARES, S.S.; MARTINS, H.; GUTIÉRREZ-MERINO, C.; AURELIANO, M. Vanadium and cadmium *in vivo* effects in teleost cardiac muscle: metal accumulation and oxidative stress markers. **Comp Biochem Physiol C**, v. 147, p. 198-178, 2008.

SPRAGUE; J.B. 1990. **Aquatic Toxicology**. In: Schrench; C. B. and Moyle; P. B. (Eds). *Methods for Fish Biology*. American Fisheries Society. Bethesda; Maryland; USA.p. 491-528.

STEFANO, B.; OLARIA, C.; SILVANO, F. Cholinesterase activities in the scallop *Pecten jacobaeus*: Characterization and effects of exposure to aquatic contaminants. **Sci Total Environ**, v. 392, p. 99-109, 2008.



TAVARES-DIAS, M.; MORAES, F. R. **Hematologia de Peixes Teleósteos**. Ribeirão Preto: M. Tavares-Dias 144p, 2004.

TIBURTIUS, E. R. L.; PERALTA-ZAMORA, P.; LEAL, E. S. Contaminação de águas por BTXs e processos utilizados na remediação de sítios contaminados. **Química Nova**, v. 27, p. 441-446, 2004.

WALKER, W. W. M., C.S.; OVERSTREET, R.M.; HAWKINS, W.E. . Development of aquarium fish models for environmental carcinogenesis: an intermittent flow exposure system for volatile, hydrophobic chemicals. **Journal of Applied Toxicology**, v. 5, p. 255-260, 1985.

WEELS, R. M. G.; ASHBY, M. D.; DUCAN, S. J.; MacDONALD, J. A. Comparative study of the erythrocytes and haemoglobins in nototheniid fishes from Antarctica. **Journal of Fish Biology**, v.17, p. 517-527, 1980.

WESS, C. M. T. he determination of cholinesterase in the brain tissue of tree species of freshwater fish and its inactivation in vivo. **Ecology**, v. 39, p. 194-198, 1958.

WICKLUND, A., RUNN, P., AND NORRGREN, L. Cadmium and zinc interactions in fish: Effects of zinc on the uptake, organ distribution, and elimination of 109 Cd in the zebrafish, *Brachydanio rerio*. **Arch. Environ. Contam Toxicol**, v. 17, p.345-354, 1988.

WIENER; J. G.; MARTINI; R. E.; SHEFFY; T. B.; GLASS; G. E. Factors influencing mercury concentrations in walleyes in northern Wisconsin lakes. **Trans Am Fish Soc**, v. 119, p. 862-870, 1990.

WILLS, E. D. Mechanisms of lipid peroxide formation in tissues Role of metals and haematin proteins in the catalysis of the oxidation of unsaturated fatty acids. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism**, v. 98, n. 2, p. 238-251, 1965.

WILSON; W.B.; FREEBERG; L.R.; 1980. **Toxicity of metals to marine phytoplankton cultures**. Texas A & M University at Galveston. Marine Research Laboratory; Environmental Research Laboratory (Narragansett; R.I.) U.S.EPA; Ecological Research series. EPA-600/3-80-025. 92p.

WYLLIE, H.A.; KERR, J.F.R. Currie, Cell death: The significance of apoptosis, **Int Rev Cytol** n. 68, p. 251-305, 2003.

ZAGATTO, P. A. **Ecotoxicologia**. Ed Rima: 2006. 464p.

ZANCAN-FILHO, L. C. L. S. J. Remoção por biolixiviação de enxofre de carvões do RS como forma de atenuação nas emissões de SO<sub>2</sub>. In: ORTIZ, L. T., E. C (Ed.). **Meio Ambiente e Carvão: Impactos da exploração e utilização**. Porto Alegre: FEPAM, 2002. p.641-648.